

①9 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**  
⑩ **DE 196 18 125 A 1**

⑳ Aktenzeichen: 196 18 125.9  
㉑ Anmeldetag: 6. 5. 96  
㉒ Offenlegungstag: 13. 11. 97

⑤1 Int. Cl.<sup>6</sup>:  
**A 01 H 5/00**  
C 12 N 15/63  
C 12 N 15/56  
C 12 N 9/24  
C 12 N 5/10  
C 12 N 1/00  
C 08 B 30/00  
A 23 L 1/0522  
C 08 C 4/00  
C 08 L 21/00  
C 08 J 3/20  
C 08 L 3/00

DE 196 18 125 A 1

// C05G 3/06, D06M 15/11, C09D 11/02, C09K 17/32, C04B 24/38

⑦1 Anmelder:  
PlantTec Biotechnologie GmbH Forschung und  
Entwicklung, 14473 Potsdam, DE

⑦4 Vertreter:  
Vossius & Partner GbR, 81675 München

⑦2 Erfinder:  
Erfinder wird später genannt werden

⑤4 Nucleinsäuremoleküle, die neue Debranching-Enzyme aus Kartoffel codieren

⑤7 Es werden Nucleinsäuremoleküle beschrieben, die neue Debranching-Enzyme aus Kartoffel codieren, sowie transgene Pflanzenzellen und Pflanzen, in denen es aufgrund der Expression eines Debranching-Enzyms aus Kartoffel oder der Inhibition einer solchen endogenen Debranching-Enzymaktivität zur Synthese eines in seinen Eigenschaften veränderten Amylopektins kommt.

DE 196 18 125 A 1

## Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft Nucleinsäuremoleküle, die neue Proteine aus Kartoffeln mit der enzymatischen Aktivität eines Debranching-Enzyms codieren. Ferner betrifft die Erfindung transgene Pflanzen und Pflanzenzellen, in denen es aufgrund der Expression einer zusätzlichen Debranching-Enzymaktivität aus Kartoffel oder der Inhibierung einer endogenen Debranching-Enzymaktivität zur Synthese eines Amylopektins mit einem veränderten Verzweigungsgrad kommt, sowie die aus den besagten transgenen Pflanzenzellen und Pflanzen erhaltene Stärke.

Stärke spielt sowohl als Speicherstoff in einer Vielzahl von Pflanzen als auch als nachwachsender, industriell verwertbarer Rohstoff eine wichtige Rolle und gewinnt zunehmend an Bedeutung. Für die industrielle Verwendung der Stärke ist es erforderlich, daß diese hinsichtlich der Struktur, Form und/oder sonstigen physikalisch-chemischen Parametern den Erfordernissen der verarbeitenden Industrie entspricht. Für den Einsatz in möglichst vielen Einsatzgebieten ist es darüber hinaus erforderlich, eine große Stoffvielfalt zu erreichen.

Das Polysaccharid Stärke ist aus chemisch einheitlichen Grundbausteinen, den Glucosemolekülen, aufgebaut, stellt jedoch ein komplexes Gemisch aus unterschiedlichen Molekülformen dar, die Unterschiede hinsichtlich des Polymerisationsgrades und des Auftretens von Verzweigungen aufweisen. Man unterscheidet die Amylose-Stärke, ein im wesentlichen unverzweigtes Polymer aus  $\alpha$ -1,4-glycosidisch verknüpften Glucosemolekülen, von der Amylopektin-Stärke, ein verzweigtes Polymer, bei dem die Verzweigungen durch das Auftreten von zusätzlichen  $\alpha$ -1,6-glycosidischen Verknüpfungen zustande kommen.

In typischen für die Stärkeproduktion verwendeten Pflanzen, wie z. B. Mais oder Kartoffel, kommen die beiden Stärkeformen in einem Verhältnis von ca. 25 Teilen Amylose zu 75 Teilen Amylopektin vor. Neben dem Amylopektin kommt beispielsweise beim Mais ein weiteres verzweigtes Polysaccharid, das sogenannte Phytoglycogen, vor, das sich vom Amylopektin durch einen stärkeren Verzweigungsgrad und ein anderes Löslichkeitsverhalten unterscheidet (siehe z. B. Lee et al., Arch. Biochem. Biophys. 143 (1971), 365—374; Pan und Nelson, Plant Physiol. 74 (1984), 324—328). Im Rahmen dieser Anmeldung wird der Begriff Amylopektin so verwendet, daß er das Phytoglycogen umfaßt.

Im Hinblick auf die Einheitlichkeit des Grundstoffes Stärke für seine Anwendung im industriellen Bereich werden Stärkeproduzierende Pflanzen benötigt, die beispielsweise nur noch die Komponente Amylopektin oder nur noch die Komponente Amylose enthalten. Für eine Reihe weiterer Verwendungen werden Pflanzen benötigt, die unterschiedlich stark verzweigte Amylopektin-Formen synthetisieren.

Derartige Pflanzen können beispielsweise durch Züchtung oder Mutagenesetechniken erzeugt werden. Für bestimmte Pflanzenspezies, z. B. Mais, ist bekannt, daß durch Mutagenese Sorten erzeugt werden können, die nur noch Amylopektin bilden. Für die Kartoffel wurde ebenfalls durch chemische Mutagenese bei einer haploiden Linie ein Genotyp erzeugt, der keine Amylose bildet (Hovenkamp-Hermelink, Theor. Appl. Genet. 75 (1987), 217—221).

Neben den klassischen Züchtungs- und Mutagenesetechniken werden inzwischen zunehmend gentechnische Methoden angewendet, um gezielt in den Stärkemetabolismus stärke-speichernder Pflanzen einzugreifen. Voraussetzung hierfür ist, daß DNA-Sequenzen zur Verfügung stehen, die am Stärkemetabolismus beteiligte Enzyme codieren. Bei der Kartoffel sind beispielsweise inzwischen DNA-Sequenzen, die Stärkekorn-gebundene Stärkesynthase oder Verzweigungsenzym (Q-Enzym) codieren, bekannt und zur gentechnischen Veränderung von Pflanzen verwendet worden.

Für eine weitere gezielte Veränderung der Stärke in Pflanzen, insbesondere des Verzweigungsgrades von in Pflanzen synthetisierter Stärke mit Hilfe gentechnischer Verfahren ist es nach wie vor erforderlich, DNA-Sequenzen zu identifizieren, die Enzyme codieren, die am Stärkemetabolismus, insbesondere der Verzweigung von Stärkemolekülen, beteiligt sind.

Neben den Q-Enzymen, die Verzweigungen in Stärkemoleküle einführen, kommen in Pflanzen Enzyme vor, die Verzweigungen auflösen können. Diese Enzyme werden als Debranching-Enzyme bezeichnet.

In Zuckerrübe konnte von Li et al. (Plant Physiol. 98 (1992), 1277—1284) neben fünf Endo- und zwei Exoamylasen nur ein Debranching-Enzym nachgewiesen werden. Dieses Enzym, das eine Größe von ca. 100 kD und ein pH-Optimum von 5,5 aufweist, ist in den Chloroplasten lokalisiert. Auch für Spinat wurde ein Debranching-Enzym beschrieben. Sowohl das Debranching-Enzym aus Spinat als auch das aus der Zuckerrübe besitzen bei der Reaktion mit Amylopektin als Substrat verglichen mit Pullulan als Substrat eine 5fach geringere Aktivität (Ludwig et al., Plant Physiol. 74 (1984), 856—861; Li et al., Plant Physiol. 98 (1992), 1277—1284). Für Spinat wurde die Isolierung einer cDNA, die ein Debranching-Enzym codiert, beschrieben (Renz et al., Plant Physiol. 108 (1995), 1342).

Für Mais wurde in der Literatur die Existenz eines Debranching-Enzyms beschrieben. Die entsprechende Mutante wird als su (sugary) bezeichnet. Das Gen des sugary-Locus wurde kürzlich cloniert (siehe James et al., Plant Cell 7 (1995), 417—429).

Bei der landwirtschaftlich wichtigen stärke-speichernden Kulturpflanze Kartoffel wurde die Aktivität eines Debranching-Enzyms von Hobson et al. (LT. Chem. Soc., (1951), 1451) untersucht. Es gelang der Nachweis, daß das entsprechende Enzym im Gegensatz zum Q-Enzym keine kettenverlängernde Aktivität besitzt, sondern lediglich  $\alpha$ -1,6-glycosidische Bindungen hydrolysiert. Es wurden bereits Verfahren zur Reinigung eines Debranching-Enzyms aus Kartoffel sowie partiell Peptidsequenzen des gereinigten Proteins beschrieben (WO 95/04826).

Es gab bisher keinerlei Hinweise, daß in Kartoffel weitere Debranching-Enzymformen vorkommen. Sollte dies der Fall sein, so müßte man für die Herstellung transgener Kartoffelpflanzen, die keinerlei Debranching-Enzymaktivität mehr aufweisen, z. B. um eine Veränderung des Verzweigungsgrades der Amylopektinstärke zu erzielen, alle in der Kartoffel vorkommenden Debranching-Enzymformen identifizieren und die entsprechenden

Gene oder cDNA-Sequenzen isolieren.

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, weitere möglicherweise bei Kartoffel vorkommende Debranching-Enzyme zu identifizieren bzw. entsprechende Nucleinsäuremoleküle, die diese Enzyme codieren, zu isolieren.

Diese Aufgabe wird durch die Bereitstellung der in den Patentansprüchen bezeichneten Ausführungsformen gelöst.

Somit betrifft die vorliegende Erfindung Nucleinsäuremoleküle, die Proteine mit der biologischen Aktivität eines Debranching-Enzyms aus Kartoffel codieren.

Ein derartiges Nucleinsäuremolekül codiert vorzugsweise ein Protein mit der biologischen Aktivität eines Debranching-Enzyms aus Kartoffel, das die unter Seq ID No. 2 angegebene Aminosäuresequenz aufweist. Besonders bevorzugt umfaßt ein derartiges Nucleinsäuremolekül die unter Seq ID No. 1 angegebene Nucleotidsequenz insbesondere die codierende Region.

Gegenstand der Erfindung sind ebenfalls Nucleinsäuremoleküle, die Proteine mit der biologischen Aktivität eines Debranching-Enzyms aus Kartoffel codieren und die mit einem der oben beschriebenen Nucleinsäuremoleküle hybridisieren.

Weiterhin betrifft die vorliegende Erfindung Nucleinsäuremoleküle, deren Sequenzen sich aufgrund der Degeneration des genetischen Codes von den Sequenzen der obengenannten Nucleinsäuremoleküle unterscheiden, und die ein Protein codieren, das die biologische Aktivität eines Debranching-Enzyms aus Kartoffel aufweist.

Der Begriff "aus Kartoffel" bedeutet, daß die durch die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle codierten Debranching-Enzyme typisch sind für die Spezies *Solanum tuberosum*, d. h. entweder natürlicherweise in solchen Pflanzen vorkommen, beispielsweise codiert durch genomische oder RNA-Moleküle, oder von davon abgeleiteten Molekülen. Abgeleitete Moleküle können beispielsweise durch reverse Transkription von RNA-Molekülen, Amplifikation, Mutation, Deletion, Substitution, Insertion etc. erzeugt werden. D.h. der Begriff umfaßt auch Enzyme, die von Allelen oder Derivaten von natürlicherweise in Kartoffel vorkommenden Sequenzen codiert werden. Diese können beispielsweise durch gentechnische Methoden in vivo oder in vitro erzeugt werden.

Der Begriff "Hybridisierung" bedeutet im Rahmen dieser Erfindung eine Hybridisierung unter konventionellen Hybridisierungsbedingungen, vorzugsweise unter stringenten Bedingungen, wie sie beispielsweise in Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2. Aufl. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY beschrieben sind. Nucleinsäuremoleküle, die mit den erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekülen hybridisieren, können prinzipiell aus jeder beliebigen Kartoffelpflanze stammen.

Nucleinsäuremoleküle, die mit den erfindungsgemäßen Molekülen hybridisieren, können z. B. aus genomischen oder aus cDNA-Bibliotheken isoliert werden.

Die Identifizierung und Isolierung derartiger Nucleinsäuremoleküle kann dabei unter Verwendung der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle oder Teile dieser Moleküle bzw. der reversen Komplemente dieser Moleküle erfolgen, z. B. mittels Hybridisierung nach Standardverfahren (siehe z. B. Sambrook et al., 1989, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2. Aufl. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY) oder durch Amplifikation mittels PCR.

Als Hybridisierungsprobe können z. B. Nucleinsäuremoleküle verwendet werden, die exakt die oder im wesentlichen die unter Seq ID No. 1 angegebene Nucleotidsequenz oder Teile dieser Sequenz aufweisen. Bei den als Hybridisierungsprobe verwendeten Fragmenten kann es sich auch um synthetische Fragmente handeln, die mit Hilfe der gängigen Synthesetechniken hergestellt wurden und deren Sequenz im wesentlichen mit der eines erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküls übereinstimmt. Hat man Gene identifiziert und isoliert, die mit den erfindungsgemäßen Nucleinsäuresequenzen hybridisieren, ist eine Bestimmung der Sequenz und eine Analyse der Eigenschaften der von dieser Sequenz codierten Proteine erforderlich.

Die mit den erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekülen hybridisierenden Moleküle umfassen insbesondere Fragmente, Derivate und allelische Varianten der oben beschriebenen DNA-Moleküle, die ein Protein codieren mit der enzymatischen Aktivität eines Debranching-Enzyms aus Kartoffel oder ein biologisch, d. h. enzymatisch aktives Fragment davon. Unter Fragmenten werden dabei Teile der Nucleinsäuremoleküle verstanden, die lang genug sind, um ein Polypeptid mit der enzymatischen Aktivität eines Debranching-Enzyms zu codieren. Der Ausdruck Derivat bedeutet in diesem Zusammenhang, daß die Sequenzen dieser Moleküle sich von den Sequenzen der oben beschriebenen Nucleinsäuremoleküle an einer oder mehreren Positionen unterscheiden und ein n hohen Grad an Homologie zu diesen Sequenzen aufweisen. Homologie bedeutet dabei eine Sequenzidentität von mindestens 70%, insbesondere eine Identität von mindestens 80%, vorzugsweise über 90% und besonders bevorzugt über 95%. Die Abweichungen zu den oben beschriebenen Nucleinsäuremolekülen können dabei durch Deletion, Addition, Substitution, Insertion oder Rekombination entstanden sein.

Homologie bedeutet ferner, daß funktionelle und/oder strukturelle Äquivalenz zwischen den betreffenden Nucleinsäuremolekülen oder den durch sie codierten Proteinen, besteht. Bei den Nucleinsäuremolekülen, die homolog zu den oben beschriebenen Molekülen sind und Derivate dieser Moleküle darstellen, handelt es sich in der Regel um Variationen der Moleküle, die Modifikationen darstellen, die dieselbe biologische Funktion ausüben. Es kann sich dabei sowohl um natürlicherweise auftretende Variationen handeln, beispielsweise um Sequenzen aus anderen Kartoffelpflanzen oder -sorten, oder um Mutationen, wobei diese Mutationen auf natürliche Weise aufgetreten sein können oder durch gezielte Mutagenese eingeführt wurden. Ferner kann es sich bei den Variationen um synthetisch hergestellte Sequenzen handeln. Bei den allelischen Varianten kann es sich sowohl um natürlich auftretende Varianten handeln, als auch um synthetisch hergestellte oder durch rekombinante DNA-Techniken erzeugte Varianten.

Die von den verschiedenen Varianten der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle codierten Proteine

veränderten Verzweigungsgrad bilden, können beispielsweise durch ein Verfahren hergestellt werden, das folgende Schritte umfaßt:

(a) Herstellung einer Expressionskassette, die folgende DNA-Sequenzen umfaßt:

- (i) einen Promotor, der die Transkription in pflanzlichen Zellen gewährleistet;
- (ii) mindestens eine erfindungsgemäße Nucleinsäuresequenz, die ein Protein mit der enzymatischen Aktivität eines Debranching-Enzyms codiert oder einen Teil eines solchen Proteins und die in antisense-Orientierung an das 3'-Ende des Promotors gekoppelt ist; und
- (iii) gegebenenfalls ein Terminationssignal für die Termination der Transkription und die Addition eines poly-A-Schwanzes an das entstehende Transkript, das an das 3'-Ende der codierenden Region gekoppelt ist; und

(b) Transformation pflanzlicher Zellen mit der in Schritt (a) hergestellten Expressionskassette.

Für den unter (i) genannten Promotor kommt im Prinzip jeder in den für die Transformation gewählten Pflanzen funktionale Promotor in Betracht. Der Promotor kann homolog oder heterolog in bezug auf die verwendete Pflanzenspezies sein. Geeignet ist beispielsweise der 35S-Promotor des Cauliflower-Mosaik-Virus (Odell et al., *Nature* 313 (1985), 810–812), der eine konstitutive Expression in allen Geweben einer Pflanze gewährleistet und das in der WO/9401571 beschriebene Promotorkonstrukt. Ein anderes Beispiel sind die Promotoren der Polyubiquitine aus Mais (Christensen et al., *Plant Mol. Biol.* 18 (1992) 675–689. Es können jedoch auch Promotoren verwendet werden, die nur zu einem durch äußere Einflüsse determinierten Zeitpunkt (siehe beispielsweise WO/9307279).

Von besonderem Interesse können hierbei Promotoren von heatshock-Proteinen sein, die eine einfache Induktion erlauben. Ferner können die Promotoren verwendet werden, die in einem bestimmten Gewebe der Pflanze zu einer Expression nachgeschalteter Sequenzen führen (siehe z. B. Stockhaus et al., *EMBO J.* 8 (1989), 2245–2251). Präferentiell werden Promotoren eingesetzt, die in den stärkespeichernden Organen der zu transformierenden Pflanzen aktiv sind. Dies sind z. B. bei Mais die Maiskörner, während es bei der Kartoffel die Knollen sind. Zur Überexpression der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle in der Kartoffel kann beispielsweise der knollenspezifische B33-Promotor (Rocha-Sosa et al., *EMBO J.* 8 (1989), 23–29) verwendet werden.

Samenspezifische Promotoren sind bereits für verschiedene Pflanzenspezies beschrieben worden. So z. B. der USP-Promotor aus *Vicia faba*, der eine samenspezifische Expression in *V. faba* und anderen Pflanzen gewährleistet (Fiedler et al., *Plant Mol. Biol.* 22 (1993), 669–679; Bäuml et al., *Mol. Gen. Genet.* 225 (1991), 459–467). In Mais gewährleisten beispielsweise Promotoren der Zein-Gene eine spezifische Expression im Endosperm der Maiskörner (Pedersen et al., *Cell* 29 (1982), 1015–1026; Quattrocchio et al., *Plant Mol. Biol.* 15 (1990), 81–93).

In dem Fall, daß die unter Verfahrensschritt (a) (ii) genannte, Nucleinsäuresequenz, die ein Protein mit der enzymatischen Aktivität eines Debranching-Enzyms aus Kartoffel codiert, in sense-Orientierung mit dem Promotor verknüpft ist, kann diese Nucleinsäuresequenz sowohl nativen bzw. homologen Ursprungs als auch fremden bzw. heterologen Ursprungs in bezug auf die zu transformierende Pflanzenspezies sein, d. h. es können sowohl Kartoffelpflanzen als auch beliebige andere Pflanzen mit der beschriebenen Expressionskassette transformiert werden, vorzugsweise die obengenannten stärkespeichernden Pflanzen.

Es besteht grundsätzlich die Möglichkeit, daß das synthetisierte Protein in jedem beliebigen Kompartiment der pflanzlichen Zelle lokalisiert sein kann. Pflanzliche Debranching-Enzyme sind in der Regel in den Plastiden lokalisiert und besitzen daher eine Signalsequenz für die Translokation in diese Organellen. Um die Lokalisation in einem anderen Kompartiment der Zelle zu erreichen, muß die DNA-Sequenz, die diese Signalsequenz codiert, entfernt werden und die codierende Region mit DNA-Sequenzen verknüpft werden, die die Lokalisierung in dem jeweiligen Kompartiment gewährleisten. Derartige Sequenzen sind bekannt (Siehe beispielsweise Braun et al., *EMBO J.* 11 (1992), 3219–3227; Wolter et al., *Proc.*

*Natl. Acad. Sci. USA* 85 (1988), 846–850; Sonnewald et al., *Plant J.* 1 (1991), 95–106).

In dem Fall, daß die unter Verfahrensschritt (a) (ii) genannte Nucleinsäuresequenz aus Kartoffel, die ein Protein mit der enzymatischen Aktivität eines Debranching-Enzyms codiert, in antisense-Orientierung mit dem Promotor verknüpft ist, handelt es sich bei dieser vorzugsweise um eine Nucleinsäuresequenz homologen Ursprungs in bezug auf die zu transformierende Pflanzen. Es können jedoch auch Nucleinsäuresequenzen verwendet werden, die einen hohen Grad an Homologie zu endogen vorhandenen Debranching-Enzym-Genen haben, insbesondere Homologien höher als 80%, vorzugsweise Homologien zwischen 90% und 100% und besonders bevorzugt Homologien über 95%.

Es können Sequenzen bis zu einer Mindestlänge von 15 bp verwendet werden. Eine inhibierende Wirkung ist aber auch bei der Verwendung kürzerer Sequenzen nicht ausgeschlossen. Bevorzugt werden längere Sequenzen zwischen 100 und 500 Basenpaaren verwendet, für eine effiziente antisense-Inhibition werden insbesondere Sequenzen mit einer Länge über 500 Basenpaaren verwendet. In der Regel werden Sequenzen verwendet, die kürzer als 5000 Basenpaare sind, bevorzugt Sequenzen, die kürzer als 2500 Basenpaare sind.

Terminationssignale für die Transkription in pflanzlichen Zellen sind beschrieben und sind beliebig gegeneinander austauschbar. Verwendet werden kann beispielsweise die Terminationssequenz des Octopinsynthase-Gens aus *Agrobacterium tumefaciens*.

Der Transfer der gemäß Verfahrensschritt (a) konstruierten Expressionskassette in pflanzliche Zellen erfolgt vorzugsweise unter Verwendung von Plasmiden, insbesondere mit Hilfe von Plasmiden, die eine stabile Integration der Expressionskassette in das pflanzliche Genom gewährleisten.

Das oben beschriebene Verfahren zur Überexpression eines neuen Debranching-Enzyms aus Kartoffel kann prinzipiell auf alle Pflanzenspezies angewendet werden. Von Interesse sind sowohl monokotyle als auch dikotyle

das eingeführte Nucleinsäuremolekül, wenn es homolog zur transformierten Pflanzenspezies ist, im Genom an einem Ort lokalisiert ist, an dem es in nicht-transformierten Zellen natürlicherweise nicht vorkommt. Dabei kann das eingeführte Nucleinsäuremolekül entweder unter der Kontrolle seines natürlichen Promotors stehen oder mit regulatorischen Elementen fremder Gene verknüpft sein.

Gegenstand der Erfindung sind ebenfalls transgene Pflanzen, die die oben beschriebenen transgenen Pflanzenzellen enthalten.

Bei der Pflanze, die mit den erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekülen transformiert ist, und in der aufgrund der Einführung eines solchen Moleküls ein Debranching-Enzym aus Kartoffel synthetisiert wird, kann es sich im Prinzip um jede beliebige Pflanze handeln. Vorzugsweise ist es eine monokotyle oder dikotyle Nutzpflanze, insbesondere eine Stärkespeichernde Pflanze, wie z. B. Getreidepflanzen, Leguminosen, Kartoffeln oder Maniok.

Unter Getreidepflanzen werden insbesondere monokotyle Pflanzen verstanden, die zur Ordnung Poales, bevorzugt solche, die zur Familie der Poaceae gehören. Beispiele hierfür sind die Pflanzen, die zu den Gattungen Avena (Hafer), Triticum (Weizen), Secale (Roggen), Hordeum (Gerste), Oryza (Reis), Panicum, Pennisetum, Setaria, Sorghum (Hirse), Zea (Mais) etc. gehören. Stärkespeichernde Leguminosen sind z. B. manche Arten der Gattung Pisum (z. B. Pisum sativum), Vicia (z. B. Vicia faba), Cicer (z. B. Cicer arietinum), Lens (z. B. Lens culinaris), Phaseolus (z. B. Phaseolus vulgaris und Phaseolus coccineus), etc.

Die Expression einer neuen oder zusätzlichen Debranching-Enzymaktivität aus Kartoffel in den erfindungsgemäßen transgenen Pflanzenzellen und Pflanzen hat einen Einfluß auf den Verzweigungsgrad des in den Zellen und Pflanzen synthetisierten Amylopektins. Daher besitzt eine in diesen Pflanzen synthetisierte Stärke veränderte physikalische und/oder chemische Eigenschaften im Vergleich zu Stärke aus Wildtyp-Pflanzen. Somit betrifft die Erfindung auch die aus den transgenen Pflanzenzellen oder Pflanzen erhältliche Stärke.

Gegenstand der Erfindung ist ferner Vermehrungsmaterial von erfindungsgemäßen transgenen Pflanzen, beispielsweise Samen, Früchte, Stecklinge, Knollen, Wurzelstöcke etc., wobei dieses Vermehrungsmaterial oben beschriebene transgene Pflanzenzellen enthält. Im Fall von Kartoffelpflanzen handelt es sich bei dem Vermehrungsmaterial vorzugsweise um die Knollen.

Ferner betrifft die vorliegende Erfindung transgene Pflanzenzellen von Kartoffel, bei denen die Aktivität des erfindungsgemäßen Debranching-Enzyms verringert ist aufgrund der Inhibition der Transkription oder Translation von endogenen Nucleinsäuremolekülen, die ein derartiges neues Debranching-Enzym codieren. Dies wird vorzugsweise dadurch erreicht, daß ein erfindungsgemäßes Nucleinsäuremolekül oder ein Teil davon in den entsprechenden Pflanzenzellen in antisense-Orientierung exprimiert wird und es aufgrund eines antisense-Effektes zur Verringerung der beschriebenen Debranching-Enzymaktivität kommt. Eine weitere Möglichkeit zur Verringerung der Debranching-Enzymaktivität in pflanzlichen Zellen besteht in der Expression von geeigneten Ribozymen, die spezifisch Transkripte der erfindungsgemäßen DNA-Moleküle spalten. Die Herstellung derartiger Ribozyme mit Hilfe der erfindungsgemäßen DNA-Moleküle ist dem Fachmann geläufig. Möglich ist auch die Expression von Molekülen, die sowohl einen antisense- als auch einen Ribozymeffekt in Kombination ausüben. Alternativ kann die Verringerung der Debranching-Enzymaktivität in den Pflanzenzellen auch durch einen Cosuppressionseffekt erfolgen.

Andere Möglichkeiten, die Aktivität der beschriebenen neuen Debranching-Enzyme in pflanzlichen Zellen zu reduzieren, sind dem Fachmann bekannt, beispielsweise die Mutagenese genomischer Sequenzen, die derartige Enzyme codieren, z. B. durch "gene tagging" oder Transposon-Mutagenese oder die Expression von Antikörpern, die spezifisch die neuen Debranching-Enzyme erkennen. Die Mutagenese genomischer Sequenzen kann sowohl codierende Bereiche des Gens (Introns oder Exons) betreffen, als auch regulatorische Bereiche, insbesondere die für die Initiation der Transkription erforderlichen.

Die Erfindung betrifft ferner transgene Kartoffelpflanzen, die die oben beschriebenen transgenen Pflanzenzellen mit verringerter Debranching-Enzymaktivität enthalten.

Die Amylopektinstärke der transgenen Zellen und Pflanzen weist aufgrund der verringerten Debranching-Enzymaktivität einen veränderten Verzweigungsgrad auf im Vergleich zu Stärke aus nichttransformierten Pflanzen. Gegenstand der Erfindung ist daher ebenfalls die aus den transgenen Zellen oder Pflanzen erhältliche modifizierte Stärke.

Die Erfindung betrifft auch Vermehrungsmaterial der vorstehend beschriebenen transgenen Pflanzen, insbesondere Samen und Knollen, wobei diese vorstehend beschriebene transgene Pflanzenzellen enthalten.

Transgene Pflanzenzellen, die aufgrund der Expression einer neuen oder zusätzlichen Debranching-Enzymaktivität eine Amylopektinstärke mit einem veränderten Verzweigungsgrad bilden im Vergleich zu in Wildtyp-Pflanzen synthetisierter Amylopektinstärke, können beispielsweise durch ein Verfahren hergestellt werden, das folgende Schritte umfaßt:

- (a) Herstellung einer Expressionskassette, die folgende DNA-Sequenzen umfaßt:
  - (i) einen Promotor, der die Transkription in pflanzlichen Zellen gewährleistet;
  - (ii) mindestens eine erfindungsgemäße Nucleinsäuresequenz, die ein Protein mit der enzymatischen Aktivität eines Debranching-Enzyms codiert oder ein biologisch aktives Fragment davon und in sense-Orientierung an das 3'-Ende des Promotors gekoppelt ist; und
  - (iii) gegebenenfalls ein Terminationssignal für die Termination der Transkription und die Addition eines poly-A-Schwanzes an das entstehende Transkript, das an das 3'-Ende der codierenden Region gekoppelt ist; und
- (b) Transformation pflanzlicher Zellen mit der in Schritt (a) hergestellten Expressionskassette.

Transgene Pflanzenzellen, die aufgrund der Verringerung der beschriebenen Debranching-Enzymaktivität eine Amylopektinstärke mit einem im Vergleich zu in Wildtyp-Pflanzen synthetisierter Amylopektinstärke

veränderten Verzweigungsgrad bilden, können beispielsweise durch ein Verfahren hergestellt werden, das folgende Schritte umfaßt:

(a) Herstellung einer Expressionskassette, die folgende DNA-Sequenzen umfaßt:

- (i) einen Promotor, der die Transkription in pflanzlichen Zellen gewährleistet;
- (ii) mindestens eine erfindungsgemäße Nucleinsäuresequenz, die ein Protein mit der enzymatischen Aktivität eines Debranching-Enzyms codiert oder einen Teil eines solchen Proteins und die in antisense-Orientierung an das 3'-Ende des Promotors gekoppelt ist; und
- (iii) gegebenenfalls ein Terminationssignal für die Termination der Transkription und die Addition eines poly-A-Schwanzes an das entstehende Transkript, das an das 3'-Ende der codierenden Region gekoppelt ist; und

(b) Transformation pflanzlicher Zellen mit der in Schritt (a) hergestellten Expressionskassette.

Für den unter (i) genannten Promotor kommt im Prinzip jeder in den für die Transformation gewählten Pflanzen funktionale Promotor in Betracht. Der Promotor kann homolog oder heterolog in bezug auf die verwendete Pflanzenspezies sein. Geeignet ist beispielsweise der 35S-Promotor des Cauliflower-Mosaik-Virus (Odell et al., *Nature* 313 (1985), 810—812), der eine konstitutive Expression in allen Geweben einer Pflanze gewährleistet und das in der WO/9401571 beschriebene Promotorkonstrukt. Ein anderes Beispiel sind die Promotoren der Polyubiquitine aus Mais (Christensen et al., *Plant Mol. Biol.* 18 (1992) 675—689. Es können jedoch auch Promotoren verwendet werden, die nur zu einem durch äußere Einflüsse determinierten Zeitpunkt (siehe beispielsweise WO/9307279).

Von besonderem Interesse können hierbei Promotoren von heatshock-Proteinen sein, die eine einfache Induktion erlauben. Ferner können die Promotoren verwendet werden, die in einem bestimmten Gewebe der Pflanze zu einer Expression nachgeschalteter Sequenzen führen (siehe z. B. Stockhaus et al., *EMBO J.* 8 (1989), 2245—2251). Präferentiell werden Promotoren eingesetzt, die in den stärkespeichernden Organen der zu transformierenden Pflanzen aktiv sind. Dies sind z. B. bei Mais die Maiskörner, während es bei der Kartoffel die Knollen sind. Zur Überexpression der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle in der Kartoffel kann beispielsweise der knollenspezifische B33-Promotor (Rocha-Sosa et al., *EMBO J.* 8 (1989), 23—29) verwendet werden.

Samenspezifische Promotoren sind bereits für verschiedene Pflanzenspezies beschrieben worden. So z. B. der USP-Promotor aus *Vicia faba*, der eine samenspezifische Expression in *V. faba* und anderen Pflanzen gewährleistet (Fiedler et al., *Plant Mol. Biol.* 22 (1993), 669—679; Bäumlein et al., *Mol. Gen. Genet.* 225 (1991), 459—467). In Mais gewährleisten beispielsweise Promotoren der Zein-Gene eine spezifische Expression im Endosperm der Maiskörner (Pedersen et al., *Cell* 29 (1982), 1015—1026; Quattrocchio et al., *Plant Mol. Biol.* 15 (1990), 81—93).

In dem Fall, daß die unter Verfahrensschritt (a) (ii) genannte, Nucleinsäuresequenz, die ein Protein mit der enzymatischen Aktivität eines Debranching-Enzyms aus Kartoffel codiert, in sense-Orientierung mit dem Promotor verknüpft ist, kann diese Nucleinsäuresequenz sowohl nativen bzw. homologen Ursprungs als auch fremden bzw. heterologen Ursprungs in bezug auf die zu transformierende Pflanzenspezies sein, d. h. es können sowohl Kartoffelpflanzen als auch beliebige andere Pflanzen mit der beschriebenen Expressionskassette transformiert werden, vorzugsweise die obengenannten stärkespeichernden Pflanzen.

Es besteht grundsätzlich die Möglichkeit, daß das synthetisierte Protein in jedem beliebigen Kompartiment der pflanzlichen Zelle lokalisiert sein kann. Pflanzliche Debranching-Enzyme sind in der Regel in den Plastiden lokalisiert und besitzen daher eine Signalsequenz für die Translokation in diese Organellen. Um die Lokalisation in einem anderen Kompartiment der Zelle zu erreichen, muß die DNA-Sequenz, die diese Signalsequenz codiert, entfernt werden und die codierende Region mit DNA-Sequenzen verknüpft werden, die die Lokalisierung in dem jeweiligen Kompartiment gewährleisten. Derartige Sequenzen sind bekannt (Siehe beispielsweise Braun et al., *EMBO J.* 11 (1992), 3219—3227; Wolter et al., *Proc.*

*Natl. Acad. Sci. USA* 85 (1988), 846—850; Sonnwald et al., *Plant J.* 1 (1991), 95—106).

In dem Fall, daß die unter Verfahrensschritt (a) (ii) genannte Nucleinsäuresequenz aus Kartoffel, die ein Protein mit der enzymatischen Aktivität eines Debranching-Enzyms codiert, in antisense-Orientierung mit dem Promotor verknüpft ist, handelt es sich bei dieser vorzugsweise um eine Nucleinsäuresequenz homologen Ursprungs in bezug auf die zu transformierende Pflanzen. Es können jedoch auch Nucleinsäuresequenzen verwendet werden, die einen hohen Grad an Homologie zu endogen vorhandenen Debranching-Enzym-Genen haben, insbesondere Homologien höher als 80%, vorzugsweise Homologien zwischen 90% und 100% und besonders bevorzugt Homologien über 95%.

Es können Sequenzen bis zu einer Mindestlänge von 15 bp verwendet werden. Eine inhibierende Wirkung ist aber auch bei der Verwendung kürzerer Sequenzen nicht ausgeschlossen. Bevorzugt werden längere Sequenzen zwischen 100 und 500 Basenpaaren verwendet, für eine effiziente antisense-Inhibition werden insbesondere Sequenzen mit einer Länge über 500 Basenpaaren verwendet. In der Regel werden Sequenzen verwendet, die kürzer als 5000 Basenpaare sind, bevorzugt Sequenzen, die kürzer als 2500 Basenpaare sind.

Terminationssignale für die Transkription in pflanzlichen Zellen sind beschrieben und sind beliebig gegeneinander austauschbar. Verwendet werden kann beispielsweise die Terminationsssequenz des Octopinsynthase-Gens aus *Agrobacterium tumefaciens*.

Der Transfer der gemäß Verfahrensschritt (a) konstruierten Expressionskassette in pflanzliche Zellen erfolgt vorzugsweise unter Verwendung von Plasmiden, insbesondere mit Hilfe von Plasmiden, die eine stabile Integration der Expressionskassette in das pflanzliche Genom gewährleisten.

Das oben beschriebene Verfahren zur Überexpression eines neuen Debranching-Enzyms aus Kartoffel kann prinzipiell auf alle Pflanzenspezies angewendet werden. Von Interesse sind sowohl monokotyle als auch dikotyle

Pflanzen, insbesondere die oben beschriebenen stärke-speichernden Pflanzen. Das oben beschriebene Verfahren zur Reduktion der Debranching-Enzymaktivität wird bevorzugt auf zweikeimblättrige Pflanzen, insbesondere auf Kartoffel angewandt.

Infolge der Einführung einer gemäß den beschriebenen Verfahren konstruierten Expressionskassette kommt es in den transformierten Pflanzenzellen zur Bildung einer RNA. Ist die ein Debranching-Enzym aus Kartoffel codierende Nucleinsäuresequenz in der Expressionskassette in sense-Orientierung mit dem Promotor verknüpft, kommt es zur Synthese einer mRNA, die als Matrize für die Synthese eines zusätzlichen oder neuen Debranching-Enzyms aus Kartoffel in den pflanzlichen Zellen dienen kann. Als Folge davon weisen diese Zellen eine Aktivität bzw. eine erhöhte Aktivität des Debranching-Enzyms aus Kartoffel auf, was zu einer Veränderung des Verzweigungsgrades des in den Zellen gebildeten Amylopektins führt. Dadurch wird eine Stärke zugänglich, die sich gegenüber der natürlich vorkommenden Stärke durch eine stärker geordnete Raumstruktur sowie eine gesteigerte Einheitlichkeit auszeichnet. Dies kann unter anderem günstige Auswirkungen auf die Filmbildungseigenschaften haben.

Ist die ein Debranching-Enzym aus Kartoffel codierende Nucleinsäuresequenz dagegen in antisense-Orientierung mit dem Promotor verknüpft, so kommt es in transgenen Pflanzenzellen zur Synthese einer antisense-RNA, die die Expression von endogenen Debranching-Enzym-Genen inhibiert. Als Folge weisen diese Zellen eine reduzierte Aktivität des neuen Debranching-Enzyms aus Kartoffel auf, was zur Bildung einer modifizierten Stärke führt. Mit Hilfe der antisense-Technik ist es möglich Pflanzen herzustellen, bei denen die Expression eines endogenen Debranching-Enzym-Gens in Kartoffel in unterschiedlichem Maße inhibiert ist in einem Bereich von 0% bis zu 100%. Dies ermöglicht insbesondere die Herstellung von Kartoffelpflanzen, die Amylopektinstärke mit verschiedensten Variationen im Verzweigungsgrad synthetisieren. Dies stellt einen Vorteil gegenüber herkömmlichen Züchtungs- und Mutageneseverfahren dar, bei denen die Bereitstellung einer derartigen Vielfalt nur mit erheblichem Zeit- und Kostenaufwand möglich ist. Stark verzweigtes Amylopektin hat eine besonders große Oberfläche und eignet sich dadurch als Copolymer in besonderem Maße. Ein starker Verzweigungsgrad führt außerdem zu einer Verbesserung der Wasserlöslichkeit des Amylopektins. Diese Eigenschaft ist für bestimmte technische Anwendungen sehr vorteilhaft.

Besonders geeignet für die Produktion von verändertem Amylopektin unter Ausnutzung der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle die Debranching-Enzyme codieren ist Kartoffel. Die Anwendung der Erfindung ist jedoch nicht auf diese Pflanzenspezies beschränkt. Für die Überexpression kann jede beliebige andere Pflanzenspezies verwendet werden.

Die in den transgenen Pflanzen synthetisierte modifizierte Stärke kann mittels gängiger Methoden aus den Pflanzen oder aus den Pflanzenzellen isoliert und nach der Reinigung zur Herstellung von Nahrungsmitteln und industriellen Produkten verwendet werden.

Die erfindungsgemäßen Stärken können nach dem Fachmann bekannten Verfahren modifiziert werden und eignen sich in unmodifizierter oder modifizierter Form für verschiedene Verwendungen im Nahrungsmittel- oder Nicht-Nahrungsmittelbereich.

Grundsätzlich läßt sich die Einsatzmöglichkeit der Stärke in zwei große Bereiche unterteilen. Der eine Bereich umfaßt die Hydrolyseprodukte der Stärke, hauptsächlich Glucose und Glucanbausteine, die über enzymatische oder chemische Verfahren erhalten werden. Sie dienen als Ausgangsstoff für weitere chemische Modifikationen und Prozesse, wie Fermentation. Für eine Reduktion der Kosten kann hierbei die Einfachheit und kostengünstige Ausführung eines Hydrolyseverfahrens von Bedeutung sein. Gegenwärtig verläuft es im wesentlichen enzymatisch unter Verwendung von Amyloglucosidase. Vorstellbar wäre eine Kosteneinsparung durch einen geringeren Einsatz von Enzymen. Eine Strukturveränderung der Stärke, z. B. Oberflächenvergrößerung des Korns, leichtere Verdaulichkeit durch geringeren Verzweigungsgrad oder eine sterische Struktur, die die Zugänglichkeit für die eingesetzten Enzyme begrenzt, könnte dies bewirken.

Der andere Bereich, in dem die Stärke wegen ihrer polymeren Struktur als sogenannte native Stärke verwendet wird, gliedert sich in zwei weitere Einsatzgebiete:

### 1. Nahrungsmittelindustrie

Stärke ist ein klassischer Zusatzstoff für viele Nahrungsmittel, bei denen sie im wesentlichen die Funktion des Bindens von wäßrigen Zusatzstoffen übernimmt bzw. eine Erhöhung der Viskosität oder aber eine erhöhte Gelbildung hervorruft. Wichtige Eigenschaftsmerkmale sind das Fließ- und Sorptionsverhalten, die Quell- und Verkleisterungstemperatur, die Viskosität und Dickungsleistung, die Löslichkeit der Stärke, die Transparenz und Kleisterstruktur, die Hitze-, Scher- und Säurestabilität, die Neigung zur Retrogradation, die Fähigkeit zur Filmbildung, die Gefrier/Taustabilität, die Verdaulichkeit sowie die Fähigkeit zur Komplexbildung mit z. B. anorganischen oder organischen Ionen.

### 2. Nicht-Nahrungsmittelindustrie

In diesem großen Bereich kann die Stärke als Hilfsstoff für unterschiedliche Herstellungsprozesse bzw. als Zusatzstoff in technischen Produkten eingesetzt. Bei der Verwendung der Stärke als Hilfsstoff ist hier insbesondere die Papier- und Pappeindustrie zu nennen. Die Stärke dient dabei in erster Linie zur Retardation (Zurückhaltung von Feststoffen), der Abbindung von Füllstoff- und Feinstoffteilchen, als Festigungsmittel und zur Entwässerung. Darüber hinaus werden die günstigen Eigenschaften der Stärke in bezug auf die Steifigkeit, die Härte, den Klang, den Griff, den Glanz, die Glätte, die Spaltfestigkeit sowie die Oberflächen ausgenutzt.



## 2.1 Papier- und Pappeindustrie

Innerhalb des Papierherstellungsprozesses sind vier Anwendungsbereiche, nämlich Oberfläche, Strich, Masse und Sprühen, zu unterscheiden.

- Die Anforderungen an die Stärke in bezug auf die Oberflächenbehandlung sind im wesentlichen ein hoher Weißgrad, eine angepaßte Viskosität, eine hohe Viskositätsstabilität, eine gute Filmbildung sowie eine geringe Staubbildung. Bei der Verwendung im Strich spielt der Feststoffgehalt, eine angepaßte Viskosität, ein hohes Bindevermögen sowie eine hohe Pigmentaffinität eine wichtige Rolle. Als Zusatz zur Masse ist eine rasche, gleichmäßige, verlustfreie Verteilung, eine hohe mechanische Stabilität und eine vollständige Zurückhaltung im Papierfließ von Bedeutung. Beim Einsatz der Stärke im Sprühbereich sind ebenfalls ein angepaßter Feststoffgehalt, hohe Viskosität sowie ein hohes Bindevermögen von Bedeutung.

## 2.2 Klebstoffindustrie

- Ein großer Einsatzbereich der Stärken besteht in der Klebstoffindustrie, wo man die Einsatzmöglichkeiten in vier Teilbereiche gliedert: die Verwendung als reinem Stärkeleim, die Verwendung bei mit speziellen Chemikalien aufbereiteten Stärkeleimen, die Verwendung von Stärke als Zusatz zu synthetischen Harzen und Polymerdispersionen sowie die Verwendung von Stärken als Streckmittel für synthetische Klebstoffe. 90% der Klebstoffe auf Stärkebasis werden in den Bereichen Wellpappenherstellung, Herstellung von Papiersäcken, Beuteln und Tüten, Herstellung von Verbundmaterialien für Papier und Aluminium, Herstellung von Kartonagen und Wiederbefeuchtungsleim für Briefumschläge, Briefmarken usw. eingesetzt.

## 2.3 Textil- und Textilpflegemittelindustrie

- Ein großes Einsatzfeld für die Stärken als Hilfsmittel und Zusatzstoff ist der Bereich Herstellung von Textilien und Textilpflegemitteln. Innerhalb der Textilindustrie sind die folgenden vier Einsatzbereiche zu unterscheiden: Der Einsatz der Stärke als Schlichtmittel, d. h. als Hilfsmittel zur Glättung und Stärkung des Klettverhaltens zum Schutz gegen die beim Weben angreifenden Zugkräfte sowie zur Erhöhung der Abriebfestigkeit beim Weben, Stärke als Mittel zur Textilausrüstung vor allem nach qualitätsverschlechternden Vorbehandlungen, wie Bleichen, Färben usw., Stärke als Verdickungsmittel bei der Herstellung von Farbpasten zur Verhinderung von Farbstoffdiffusionen sowie Stärke als Zusatz zu Kettungsmitteln für Nähgarne.

## 2.4 Baustoffindustrie

- Der vierte Einsatzbereich ist die Verwendung der Stärken als Zusatz bei Baustoffen. Ein Beispiel ist die Herstellung von Gipskartonplatten, bei der die im Gipsbrei vermischte Stärke mit dem Wasser verkleistert, an die Oberfläche der Gipsplatte diffundiert und dort den Karton an die Platte bindet. Weitere Einsatzbereiche sind die Beimischung zu Putz- und Mineralfasern. Bei Transportbeton werden Stärkeprodukte zur Verzögerung der Abbindung eingesetzt.

## 2.5 Bodenstabilisation

- Ein weiterer Markt für die Stärke bietet sich bei der Herstellung von Mitteln zur Bodenstabilisation an, die bei künstlichen Erdbewegungen zum temporären Schutz der Bodenpartikel gegenüber Wasser eingesetzt werden. Kombinationsprodukte aus der Stärke und Polymeremulsionen sind nach heutiger Kenntnis in ihrer Erosions- und verkrustungsmindernden Wirkung den bisher eingesetzten Produkten gleichzusetzen, liegen preislich aber deutlich unter diesen.

## 2.6 Einsatz bei Pflanzenschutz- und Düngemitteln

- Ein Einsatzbereich liegt bei der Verwendung der Stärke in Pflanzenschutzmitteln zur Veränderung der spezifischen Eigenschaften der Präparate. So kann die Stärke zur Verbesserung der Benetzung von Pflanzenschutz- und Düngemitteln, zur dosierten Freigabe der Wirkstoffe, zur Umwandlung flüssiger, flüchtiger und/oder übelriechender Wirkstoffe in mikrokristalline, stabile, formbare Substanzen, zur Mischung inkompatibler Verbindungen und zur Verlängerung der Wirkdauer durch Verminderung der Zersetzung eingesetzt werden.

## 2.7 Pharmaka, Medizin und Kosmetikindustrie

- Ein weiteres Einsatzgebiet besteht im Bereich der Pharmaka, Medizin und Kosmetikindustrie. In der pharmazeutischen Industrie kann die Stärke als Bindemittel für Tabletten oder zur Bindemittelverdünnung in Kapseln eingesetzt werden. Weiterhin kann die Stärke als Tablettensprengmittel dienen, da sie nach dem Schlucken Flüssigkeit absorbieren und nach kurzer Zeit soweit quellen, daß der Wirkstoff freigesetzt wird. Medizinische Gleit- und Wundpuder basieren aus qualitativen Gründen auf Stärke. Im Bereich der Kosmetik werden Stärken beispielsweise als Träger von Puderzusatzstoffen, wie Düften und Salicylsäure eingesetzt. Ein relativ großer Anwendungsbereich für die Stärke liegt bei Zahnpasta.



## 2.8 Stärkezusatz zu Kohlen und Briketts

Einen Einsatzbereich bietet die Stärke als Zusatzstoff zu Kohle und Brikett. Kohle kann mit einem Stärkezusatz quantitativ hochwertig agglomeriert bzw. brikettiert werden, wodurch ein frühzeitiges Zerfallen der Briketts verhindert wird. Der Stärkezusatz liegt bei Grillkohle zwischen 4 und 6%, bei kalorierter Kohle zwischen 0,1 und 0,5%. Des weiteren gewinnen Stärken als Bindemittel an Bedeutung, da durch ihren Zusatz zu Kohle und Brikett der Aussto schädlicher Stoffe deutlich vermindert werden kann.

## 2.9 Erz- und Kohleschlammaufbereitung

Die Stärke kann ferner bei der Erz- und Kohleschlammaufbereitung als Flockungsmittel eingesetzt werden.

## 2.10 Gieereihilfsstoff

Ein weiterer Einsatzbereich besteht als Zusatz zu Gieereihilfsstoffen. Bei verschiedenen Guverfahren werden Kerne benötigt, die aus Bindemittel-versetzten Sünden hergestellt werden. Als Bindemittel wird heute überwiegend Bentonit eingesetzt, das mit modifizierten Stärken, meist Quellstärken, versetzt ist.

Zweck des Strkezusatzes ist die Erhöhung der Fliefestigkeit sowie die Verbesserung der Bindefestigkeit. Darber hinaus können die Quellstärken weitere produktionstechnische Anforderungen, wie im kalten Wasser dispergierbar, rehydratisierbar, gut in Sand mischbar und hohes Wasserbindungsvermögen, aufweisen.

## 2.11 Einsatz in der Kautschukindustrie

In der Kautschukindustrie kann die Stärke zur Verbesserung der technischen und optischen Qualität eingesetzt werden. Gründe sind dabei die Verbesserung des Oberflchenglanzes, die Verbesserung des Griffs und des Aussehens, dafür wird Stärke vor der Kaltvulkanisation auf die klebrigen gummierten Flächen von Kautschukstoffen gestreut, sowie die Verbesserung der Bedruckbarkeit des Kautschuks.

## 2.12 Herstellung von Lederersatzstoffen

Eine weitere Absatzmöglichkeit der modifizierten Stärken besteht bei der Herstellung von Lederersatzstoffen.

## 2.13 Stärke in synthetischen Polymeren

Auf dem Kunststoffsektor zeichnen sich folgende Einsatzgebiete ab: die Einbindung von Strkefolgeprodukten in den Verarbeitungsproze (Stärke ist nur Füllstoff, es besteht keine direkte Bindung zwischen synthetischem Polymer und Stärke) oder alternativ die Einbindung von Strkefolgeprodukten in die Herstellung von Polymeren (Stärke und Polymer gehen eine feste Bindung ein).

Die Verwendung der Stärke als reinem Füllstoff ist verglichen mit den anderen Stoffen wie Talkum nicht wettbewerbsfähig. Anders sieht es aus, wenn die spezifischen Strkeigenschaften zum Tragen kommen und hierdurch das Eigenschaftsprofil der Endprodukte deutlich verändert wird. Ein Beispiel hierfür ist die Anwendung von Strkeprodukten bei der Verarbeitung von Thermoplasten, wie Polyäthylen. Hierbei werden die Stärke und das synthetische Polymer durch Koexpression im Verhältnis von 1 : 1 zu einem 'master batch' kombiniert, aus dem mit granuliertem Polyäthylen unter Anwendung herkömmlicher Verfahrenstechniken diverse Produkte hergestellt werden. Durch die Einbindung von Stärke in Polythylenfolien kann eine erhöhte Stoffdurchlssigkeit bei Hohlkörpern, eine verbesserte Wasserdampfdurchlässigkeit, ein verbessertes Antistatikverhalten, ein verbessertes Antiblockverhalten sowie eine verbesserte Bedruckbarkeit mit wrigen Farben erreicht werden.

Eine andere Möglichkeit ist die Anwendung der Stärke in Polyurethanschäumen. Mit der Adaption der Stärkederivate sowie durch die verfahrenstechnische Optimierung ist es möglich, die Reaktion zwischen synthetischen Polymeren und den Hydroxygruppen der Stärken gezielt zu steuern. Das Ergebnis sind Polyurethanfolien, die durch die Anwendung von Stärke folgende Eigenschaftsprofile erhalten: eine Verringerung des Wärmeausdehnungskoeffizienten, Verringerung des Schrumpfverhaltens, Verbesserung des Druck/Spannungsverhaltens, Zunahme der Wasserdampfdurchlässigkeit ohne Veränderung der Wasseraufnahme, Verringerung der Entflammbarkeit und der Aufridichte, kein Abtropfen brennbarer Teile, Halogenfreiheit und verminderte Alterung. Nachteile, die gegenwärtig noch vorhanden sind, sind verringerte Druckfestigkeit sowie eine verringerte Schlagfestigkeit.

Die Produktentwicklung beschränkt sich inzwischen nicht mehr nur auf Folien. Auch feste Kunststoffprodukte, wie Töpfe, Platten und Schalen, sind mit einem Stärkegehalt von über 50% herzustellen. Des weiteren sind Stärke/Polymermischungen günstig zu beurteilen, da sie eine sehr viel höhere biologische Abbaubarkeit aufweisen.

Auerordentliche Bedeutung haben weiterhin auf Grund ihres extremen Wasserbindungsvermögen Strkepfropfpolymerisate gewonnen. Dies sind Produkte mit einem Rückgrat aus Stärke und einer nach dem Prinzip des Radikalkettenmechanismus aufgepfropften Seitengitters eines synthetischen Monomers. Die heute verfügbaren Strkepfropfpolymerisate zeichnen sich durch ein besseres Binde- und Rückhaltevermögen von bis zu 1000 g Wasser pro g Stärke bei hoher Viskosität aus. Die Anwendungsbereiche für diese Superabsorber haben sich in den letzten Jahren stark ausgeweitet und liegen im Hygienebereich mit Produkten Windeln und Unterlagen

sowie im landwirtschaftlichen Sektor, z. B. bei Saatgutpillierungen.

Entscheidend für den Einsatz der neuen, gentechnisch veränderten Stärken sind zum einen die Struktur, Wassergehalt, Proteingehalt, Lipidgehalt, Fasergehalt, Asche/Phosphatgehalt, Amylose/Amylopektinverhältnis, Molmassenverteilung, Verzweigungsgrad, Korngröße und -form sowie Kristallinität, zum anderen auch die Eigenschaften, die in folgende Merkmale münden: Fließ- und Sorptionsverhalten, Verkleisterungstemperatur, Viskosität, Dickungsleistung, Löslichkeit, Kleisterstruktur und -transparenz, Hitze-, Scher- und Säurestabilität, Retrogradationsneigung, Gelbildung, Gefrier/Taustabilität, Komplexbildung, Jodbindung, Filmbildung, Klebekraft, Enzymstabilität, Verdaulichkeit und Reaktivität.

Die Erzeugung modifizierter Stärken mittels gentechnischer Eingriffe in einer transgenen Pflanze kann zum einen die Eigenschaften der aus der Pflanze gewonnenen Stärke dahingehend verändern, daß weitere Modifikationen mittels chemischer oder physikalischer Verfahren nicht mehr notwendig erscheinen. Zum anderen können die durch gentechnische Verfahren veränderte Stärken weiteren chemischen Modifikationen unterworfen werden, was zu weiteren Verbesserungen der Qualität für bestimmte der oben beschriebenen Einsatzgebiete führt. Diese chemischen Modifikationen sind grundsätzlich bekannt. Insbesondere handelt es sich dabei um

- Hitzebehandlung,
- Säurebehandlung,
- Oxidation und
- Veresterungen,

welche zur Entstehung von Phosphat-, Nitrat-, Sulfat-, Xanthat-, Acetat- und Citratstärken führen. Weitere organische Säuren können ebenfalls zur Veresterung eingesetzt werden:

- Erzeugung von Stärkeethern Stärke-Alkylether, O-Allylether, Hydroxylalkylether, O-Carboxylmethylether, N-haltige Stärkeether, P-haltige Stärkeether, S-haltige Stärkeether
- Erzeugung von vernetzten Stärken
- Erzeugung von Stärke-Pfropf-Polymerisaten

Die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle können prinzipiell ferner auch dazu verwendet werden, Pflanzen herzustellen, bei denen die Aktivität des erfindungsgemäßen Debranching-Enzyms erhöht oder verringert ist und gleichzeitig die Aktivitäten anderer, an der Stärkebiosynthese beteiligter Enzyme verändert sind. Dabei sind alle Kombinationen und Permutationen denkbar. Beispielsweise können Nucleinsäuremoleküle, die für ein erfindungsgemäßes Protein codieren oder entsprechende antisense-Konstrukte, in Pflanzenzellen eingebracht werden, bei denen bereits die Synthese endogener Debranching-Enzyme, GBSS I-, SSS I-, II- oder GBSS II-Proteine aufgrund eines antisense-Effektes oder einer Mutation inhibiert ist oder die Synthese des Verzweigungsenzyms inhibiert ist (wie z. B. beschrieben in WO 92/14827 oder der ae-Mutante von Mais (Shannon und Garwood, in Whistler, BeMiller und Paschall, Starch: Chemistry and Technology, Academic Press, London, 2nd Edition (1984), 25—86)).

Soll die Inhibierung der Synthese mehrerer Debranching-Enzyme in transformierten Pflanzen erreicht werden, so können DNA-Moleküle zur Transformation verwendet werden, die gleichzeitig mehrere, die entsprechenden Debranching-Enzyme codierenden Regionen in antisense-Orientierung unter der Kontrolle eines geeigneten Promotors enthalten. Hierbei kann alternativ jede Sequenz unter der Kontrolle eines eigenen Promotors stehen, oder die Sequenzen können als Fusion von einem gemeinsamen Promotor transkribiert werden. Letztere Alternative wird in der Regel vorzuziehen sein, da in diesem Fall die Synthese der entsprechenden Proteine in etwa gleichem Maße inhibiert werden sollte.

Weiterhin ist die Konstruktion von DNA-Molekülen möglich, bei denen neben DNA-Sequenzen, die Debranching-Enzyme codieren, weitere DNA-Sequenzen, die andere Proteine, die an der Stärkesynthese oder -modifikation beteiligt sind, in antisense-Orientierung an einem geeigneten Promotor gekoppelt sind. Die Sequenzen können hierbei wiederum hintereinandergeschaltet sein und von einem gemeinsamen Promotor transkribiert werden. Für die Länge der einzelnen codierenden Regionen, die in einem derartigen Konstrukt verwendet werden, gilt das, was oben bereits für die Herstellung von antisense-Konstrukten ausgeführt wurde. Eine obere Grenze für die Anzahl der in einem derartigen DNA-Molekül von einem Promotor aus transkribierten antisense-Fragmente gibt es nicht. Das entstehende Transkript sollte aber in der Regel eine Länge von nicht mehr als 20 kb, vorzugsweise von nicht mehr als 5 kb haben.

Codierende Regionen, die in derartigen DNA-Molekülen in Kombination mit anderen codierenden Regionen in antisense-Orientierung hinter einem geeigneten Promotor lokalisiert sind, können aus DNA-Sequenzen stammen, die für folgende Proteine codieren: Stärkekorn-gebundene (GBSS I und II) und lösliche Stärkesynthasen (z. B. SSS I und II), Verzweigungsenzyme, andere Debranching-Enzyme, Disproportionierungsenzyme und Stärkephosphorylasen. Dies ist nur eine beispielhafte Aufzählung. Auch die Verwendung anderer DNA-Sequenzen im Rahmen einer derartigen Kombination ist denkbar.

Mit Hilfe derartiger Konstrukte ist es möglich, in Pflanzenzellen, die mit diesen transformiert wurde, die Synthese mehrerer Enzyme gleichzeitig zu inhibieren.

Weiterhin können die Konstrukte in klassische Mutanten eingebracht werden, die für ein oder mehrere Gene der Stärkebiosynthese defekt sind. Diese Defekte können sich z. B. auf folgende Proteine beziehen: Stärkekorn-gebundene (GBSS I und II) und lösliche Stärkesynthasen (z. B. SSS I und II), Verzweigungsenzyme (BE I und II), Debranching-Enzyme, Disproportionierungsenzyme und Stärkephosphorylasen. Dies ist wiederum nur eine beispielhafte Aufzählung.

Zur Vorbereitung der Einführung fremder Gene in höhere Pflanzen stehen eine große Anzahl von Clonierungsvektoren zur Verfügung, die ein Replikationssignal für *E. coli* und ein Markergen zur Selektion transformierter Bakterienzellen enthalten. Beispiele für derartige Vektoren sind pBR322, pUC-Serien, M13mp-Serien, pACYC184 usw. Die gewünschte Sequenz kann an einer passenden Restriktionsschnittstelle in den Vektor eingeführt werden. Das erhaltene Plasmid wird für die Transformation von *E. coli*-Zellen verwendet. Transformierte *E. coli*-Zellen werden in einem geeigneten Medium gezüchtet, anschließend geerntet und lysiert. Das Plasmid wird wiedergewonnen. Als Analysemethoden zur Charakterisierung der gewonnenen Plasmid-DNA werden im allgemeinen Restriktionsanalysen, Gelelektrophoresen und weitere biochemisch-molekularbiologische Methoden eingesetzt. Nach jeder Manipulation kann die Plasmid-DNA gespalten und gewonnene DNA-Fragmente mit anderen DNA-Sequenzen verknüpft werden. Jede Plasmid-DNA-Sequenz kann in den gleichen oder anderen Plasmiden cloniert werden.

Für die Einführung von DNA in eine pflanzliche Wirtszelle stehen eine Vielzahl von Techniken zur Verfügung. Diese Techniken umfassen die Transformation pflanzlicher Zellen mit T-DNA unter Verwendung von *Agrobacterium tumefaciens* oder *Agrobacterium rhizogenes* als Transformationsmittel, die Fusion von Protoplasten, die Injektion, die Elektroporation von DNA, die Einbringung von DNA mittels der biolistischen Methode sowie weitere Möglichkeiten.

Bei der Injektion und Elektroporation von DNA in Pflanzenzellen werden an sich keine speziellen Anforderungen an die verwendeten Plasmide gestellt. Es können einfache Plasmide wie z. B. pUC-Derivate verwendet werden. Sollen aber aus derartig transformierten Zellen ganze Pflanzen regeneriert werden, ist die Anwesenheit eines selektierbaren Markergens notwendig.

Je nach Einführungsmethode gewünschter Gene in die Pflanzenzelle können weitere DNA-Sequenzen erforderlich sein. Werden z. B. für die Transformation der Pflanzenzelle das Ti- oder Ri-Plasmid verwendet, so muß mindestens die rechte Begrenzung, häufig jedoch die rechte und linke Begrenzung der Ti- und Ri-Plasmid-T-DNA als Flankenbereich mit den einzuführenden Genen verbunden werden.

Werden für die Transformation Agrobakterien verwendet, muß die einzuführende DNA in spezielle Plasmide cloniert werden, und zwar entweder in einen intermediären Vektor oder in einen binären Vektor. Die intermediären Vektoren können aufgrund von Sequenzen, die homolog zu Sequenzen in der T-DNA sind, durch homologe Rekombination in das Ti- oder Ri-Plasmid der Agrobakterien integriert werden. Dieses enthält außerdem die für den Transfer der T-DNA notwendige *vir*-Region. Intermediäre Vektoren können nicht in Agrobakterien replizieren. Mittels eines Helferplasmids kann der intermediäre Vektor auf *Agrobacterium tumefaciens* übertragen werden (Konjugation). Binäre Vektoren können sowohl in *E. coli* als auch in Agrobakterien replizieren. Sie enthalten ein Selektionsmarker-Gen und einen Linker oder Polylinker, welche von der rechten und linken T-DNA Grenzregion eingerahmt werden. Sie können direkt in die Agrobakterien transformiert werden (Holsters et al. Mol. Gen. Genet. 163 (1978), 181—187). Das als Wirtszelle dienende Agrobakterium soll ein Plasmid, das eine *vir*-Region trägt, enthalten. Die *vir*-Region ist für den Transfer der T-DNA in die Pflanzenzelle notwendig. Zusätzliche T-DNA kann vorhanden sein. Das derartig transformierte Agrobakterium wird zur Transformation von Pflanzenzellen verwendet.

Die Verwendung von T-DNA für die Transformation von Pflanzenzellen ist intensiv untersucht und ausreichend in EP 120 516; Hoekema, In: The Binary Plant Vector System Offsetdrukkerij Kanters B.V., Alblasterdam (1985), Chapter V; Fraley et al., Crit. Rev. Plant Sci., 4, 1—46 und An et al. EMBO LT. 4 (1985), 277—287 beschrieben worden.

Für den Transfer der DNA in die Pflanzenzelle können Pflanzen-Explantate zweckmäßigerweise mit *Agrobacterium tumefaciens* oder *Agrobacterium rhizogenes* kokultiviert werden. Aus dem infizierten Pflanzenmaterial (z. B. Blattstücke, Stengelsegmente, Wurzeln, aber auch Protoplasten oder Suspensions-kultivierte Pflanzenzellen) können dann in einem geeigneten Medium, welches Antibiotika oder Biozide zur Selektion transformierter Zellen enthalten kann, wieder ganze Pflanzen regeneriert werden. Die so erhaltenen Pflanzen können dann auf Anwesenheit der eingeführten DNA untersucht werden. Andere Möglichkeiten der Einführung fremder DNA unter Verwendung des biolistischen Verfahrens oder durch Protoplastentransformation sind bekannt (vgl. z. B. Willmitzer, L., 1993 Transgenic plants. In: Biotechnology, A Multi-Volume Comprehensive Treatise (H.L.T. Rehm, G. Reed, A. Pühler, P. Stadler, eds.), Vol. 2, 627—659, VCH Weinheim-New York-Basel-Cambridge).

Während die Transformation dikotyler Pflanzen über Ti-Plasmid-Vektorsysteme mit Hilfe von *Agrobacterium tumefaciens* wohl etabliert ist, weisen neuere Arbeiten darauf hin, daß auch monokotyle Pflanzen der Transformation mittels *Agrobacterium* basierender Vektoren sehr wohl zugänglich sind (Chan et al., Plant Mol. Biol. 22 (1993), 491—506; Hiei et al., Plant LT. 6 (1994), 271—282; Deng et al., Science in China 33 (1990), 28—34; Wilmink et al., Plant Cell Reports 11 (1992), 76—80; May et al., Bio/Technology 13 (1995), 486—492; Conner und Domisse; Int. LT. Plant Sci. 153 (1992), 550—555; Ritchie et al., Transgenic Res. 2 (1993), 252—265).

Alternative Systeme zur Transformation von monokotylen Pflanzen sind die Transformation mittels des biolistischen Ansatzes (Wan und Lemaux, Plant Physiol. 104 (1994), 37—48; Vasil et al., Bio/Technology 11 (1993), 1553—1558; Ritala et al., Plant Mol. Biol. 24 (1994), 317—325; Spencer et al., Theor. Appl. Genet. 79 (1990), 625—631), die Protoplastentransformation, die Elektroporation von partiell permeabilisierten Zellen, die Einbringung von DNA mittels Glasfasern.

Spezifisch die Transformation von Mais wird in der Literatur verschiedentlich beschrieben (vgl. z. B. WO 95/06128, EP 0 513 849; EP 0 465 875; Fromm et al., Biotechnology 8 (1990), 833—844; Gordon-Kamm et al., Plant Cell 2 (1990), 603—618; Koziel et al., Biotechnology 11 (1993), 194—200) In EP 292 435 wird ein Verfahren beschrieben, mit Hilfe dessen, ausgehend von einem schleimlosen, weichen (friable) granulösen Mais-Kallus, fertile Pflanzen erhalten werden können. Shillito et al. (Bio/Technology 7 (1989), 581) haben in dies m Zusammenhang beobachtet, daß es ferner für die Regnerierbarkeit zu fertilen Pflanzen notwendig ist, von Kallus-Suspensionskulturen auszugehen, aus denen eine sich teilende Protoplastenkultur, mit der Fähigkeit zu Pflanzen zu

regenerieren, herstellbar ist. Nach einer in vitro Kultivierungszeit von 7 bis 8 Monaten erhalten Shillito et al. Pflanzen mit lebensfähigen Nachkommen, die jedoch Abnormalitäten in der Morphologie und der Reproduktivität aufweisen.

Prioli und Söndahl (Bio/Technology 7 (1989), 589) beschreiben die Regeneration und die Gewinnung fertiler Pflanzen aus Mais-Protoplasten der Cateto Mais-Inzuchtlinie Cat 100-1. Die Autoren vermuten, daß die Protoplasten-Regeneration zu fertilen Pflanzen abhängig ist von einer Anzahl verschiedener Faktoren, wie z. B. von Genotyp, vom physiologischen Zustand der Donor-Zellen und von den Kultivierungsbedingungen. Auch die erfolgreiche Transformation anderer Getreidearten wurde bereits beschrieben, z. B. für Gerste (Wan und Lemaux, s. o.; Ritala et al., s. o.) und für Weizen (Nehra et al., Plant J. 5 (1994), 285—297).

Ist die eingeführte DNA einmal im Genom der Pflanzenzelle integriert, so ist sie dort in der Regel stabil und bleibt auch in den Nachkommen der ursprünglich transformierten Zelle erhalten. Sie enthält normalerweise einen Selektionsmarker, der den transformierten Pflanzenzellen Resistenz gegenüber einem Biozid oder einem Antibiotikum wie Kanamycin, G 418, Bleomycin, Hygromycin oder Phosphinotricin u. a. vermittelt. Der individuelle gewählte Marker sollte daher die Selektion transformierter Zellen gegenüber Zellen, denen die eingeführte DNA fehlt, gestatten.

Die transformierten Zellen wachsen innerhalb der Pflanze in der üblichen Weise (siehe auch McCormick et al., Plant Cell Reports 5 (1986), 81—84). Die resultierenden Pflanzen können normal angezogen werden und mit Pflanzen, die die gleiche transformierte Erbanlage oder andere Erbanlagen besitzen, gekreuzt werden. Die daraus entstehenden hybriden Individuen haben die entsprechenden phänotypischen Eigenschaften. Von den Pflanzenzellen können Samen gewonnen werden.

Es sollten zwei oder mehrere Generationen angezogen werden, um sicherzustellen, daß das phänotypische Merkmal stabil beibehalten und vererbt wird. Auch sollten Samen geerntet werden, um sicherzustellen, daß der entsprechende Phänotyp oder andere Eigenarten erhalten geblieben sind.

Ferner betrifft die Erfindung die Verwendung der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle zur Herstellung von Pflanzen, die eine Amylopektinstärke mit einem veränderten Verzweigungsgrad im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen synthetisieren.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle oder Teile dieser Moleküle bzw. der reversen Komplemente dieser Moleküle zur Identifizierung und Isolierung homologer Moleküle, die Proteine mit der enzymatischen Aktivität eines Debranching-Enzyms codieren oder Fragmente derartiger Proteine, aus Pflanzen oder anderen Organismen. Für die Definition des Begriffs "Homologie" siehe oben.

Die Beispiele erläutern die Erfindung.

In den Beispielen werden die folgenden Methoden verwendet:

### 1. Clonierungsverfahren

Zur Clonierung in E.coli wurde der Vektor pBluescript II SK (Stratagene) verwendet.

### 2. Bakterienstämme

Für den Bluescript-Vektor und für die pUSP-Konstrukte wurde der E.coli-Stamm DH5 $\alpha$  (Bethesda Research Laboratories, Gaithersburgh, USA) verwendet. Für die in vivo excision wurde der E.coli-Stamm XL1-Blue verwendet.

### 3. Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten

Die radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten wurde mit Hilfe eines DNA-Random Primer Labelling Kits der Firma Boehringer (Deutschland) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

#### Beispiel 1

Clonierung einer cDNA, die ein neues Debranching-Enzym aus Solanum tuberosum codiert

Zur Isolierung von cDNA-Molekülen, die ein neues Debranching-Enzym aus Solanum tuberosum codieren, wurde eine cDNA-Bibliothek ausgehend von polyA<sup>+</sup>-RNA aus Knollenmaterial in dem Vektor Lambda ZAPII (Stratagene) erstellt und in Phagenköpfe verpackt. E. coli-Zellen des Stammes XL1-Blue wurden anschließend mit den die cDNA-Fragmente enthaltenden Phagen infiziert ( $1 \times 10^6$  pfu) und auf Medium in Petrischalen in einer Dichte von ca. 30 000 pro 75 cm<sup>2</sup> ausplattiert. Nach ca. 8 stündiger Inkubation wurden Nitrozellulosemembranen auf den lysierten Bakterienrasen aufgelegt, die nach einer Minute abgenommen wurden. Die Filter wurden für 2 min in 0,5 M NaOH; 1,5 M NaCl, dann für 2 min in 0,5 M Tris/HCl pH 7,0 und anschließend für 2 min in 2  $\times$  SSC inkubiert. Nach Trocknung und Fixierung der DNA durch UV-Crosslinking wurden die Filter 3 h lang in Hybridisierungspuffer bei 48°C inkubiert, bevor radioaktiv markierte Probe zugesetzt wurde.

Als Probe wurde ein cDNA-Sequenz aus Mais verwendet, die in Debranching-Enzym codiert (siehe James et al., Plant Cell 7 (1995), 417—429, Nucleotide 1150—2128)].

Die Hybridisierung wurde bei 48°C durchgeführt in 2  $\times$  SSC, 10  $\times$  Dehnhardts-Lösung; 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,2; 0,2% SDS; 5 mM EDTA und 250  $\mu$ g/ml denaturierte Heringssperma-DNA.

Hybridisierende Phagenclon wurden unter Anwendung von Standardverfahren vereinzelt und weiter gereinigt. Mit Hilfe der in-vivo-excision Methode wurden von positiven Phagenclonen E. coli-Clon gewonnen, die

ein doppelsträngiges pBluescript-Plasmid mit der jeweiligen cDNA-Insertion enthalten. Nach Überprüfung der Größe und des Restriktionsmusters der Insertion wurde von geeigneten Clonen Plasmid-DNA isoliert. Ein derart isoliertes Plasmid, Iso5, besaß eine Insertion von 2295 bp.

## Beispiel 2

5

### Sequenzanalyse der cDNA-Insertion des Plasmids Iso5

Bei dem entsprechend Beispiel 1 isolierten Plasmids Iso5 wurde die Nucleotidsequenz der cDNA-Insertion durch Standardverfahren mittels der Didesoxymethode (Sanger et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 (1977), 5463—5467) bestimmt. Die Insertion ist 2295 bp lang und die Nucleotidsequenz von 2133 bp dieser Insertion sowie die abgeleitete Aminosäuresequenz ist in Seq ID No. 1 angegeben. 10

Homologievergleiche ergaben, daß es sich bei dem codierten Protein um ein neues Debranching-Enzym aus Kartoffel handelt.

Die unter Seq ID No. 1 angegebene Nucleotidsequenz repräsentiert eine partielle cDNA, die ein bisher unbekanntes Debranching-Enzym aus Kartoffel codiert. Mit Hilfe dieser Sequenz ist es möglich mittels konventioneller Methoden eine vollständige cDNA-Sequenz oder eine genomische Sequenz aus geeigneten cDNA- oder genomischen Bibliotheken zu isolieren. 15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

## (1) ALLGEMEINE ANGABEN:

## (i) ANMELDER:

(A) NAME: Institut fuer Genbiologische Forschung Berlin  
GmbH

(B) STRASSE: Ihnestrasse 63

(C) ORT: Berlin

(E) LAND: Deutschland

(F) POSTLEITZAHL: 14195

(G) TELEFON: +49 30 8300070

(H) TELEFAX: +49 30 83000736

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Nucleinsauremolekuele, die neue  
Debranching-Enzyme aus Kartoffel codieren

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 2

## (iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

(A) DATENTRÄGER: Floppy disk

(B) COMPUTER: IBM PC compatible

(C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS

(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 2133 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA zu mRNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

## (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Solanum tuberosum

## (vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:

(B) CLON(E): Iso5

## (ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS

(B) LAGE: 2..1820

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

G AAT TCG GCA CGA GGG CCA GAG GAT GAT TGT TGG CCC CCA ATG GCA  
Asn Ser Ala Arg Gly Pro Glu Asp Asp Cys Trp Pro Pro Met Ala  
1 5 10 15

46

# DE 196 18 125 A1

GGC ATG GTA CCT TCT GCT TCT GAT CAG TTT GAT TGG GAA GGA GAT CTA Gly Met Val Pro Ser Ala Ser Asp Gln Phe Asp Trp Glu Gly Asp Leu	94	
20 25 30		
TTA CTG AAG TTT CCA CAG AGA GAT CTT GTA ATC TAT GAA ATG CAT GTT Leu Leu Lys Phe Pro Gln Arg Asp Leu Val Ile Tyr Glu Met His Val	142	5
35 40 45		
CGT GGA TTT ACA AAT CAT GAG TCG AGT GAA ACA AAA TAT CCT GGT ACT Arg Gly Phe Thr Asn His Glu Ser Ser Glu Thr Lys Tyr Pro Gly Thr	190	10
50 55 60		
TAC CTT GGT GTT GTG GAG AAA CTT GAT CAC TTG AAG GAA CTT GGT GTC Tyr Leu Gly Val Val Glu Lys Leu Asp His Leu Lys Glu Leu Gly Val	238	15
65 70 75		
AAC TGT ATA GAG CTA ATG CCC TGT CAC GAG TTC AAT GAG CTG GAG TAC Asn Cys Ile Glu Leu Met Pro Cys His Glu Phe Asn Glu Leu Glu Tyr	286	20
80 85 90 95		
TAT AGT TAT AAC TCT GTA TTG GGC GAC TAC AAG TTT AAC TTT TGG GGC Tyr Ser Tyr Asn Ser Val Leu Gly Asp Tyr Lys Phe Asn Phe Trp Gly	334	25
100 105 110		
TAT TCT ACT GTC AAT TTC TTT TCT CCA ATG GGA AGA TAC TCG TCT GCT Tyr Ser Thr Val Asn Phe Phe Ser Pro Met Gly Arg Tyr Ser Ser Ala	382	30
115 120 125		
GGT CTA AGT AAT TGC GGC CTC GGT GCA ATA AAC GAA TTT AAG TAT CTT Gly Leu Ser Asn Cys Gly Leu Gly Ala Ile Asn Glu Phe Lys Tyr Leu	430	35
130 135 140		
GTC AAG GAA GCA CAT AAA CGT GGA ATC GAG GTT ATC ATG GAT GTT GTT Val Lys Glu Ala His Lys Arg Gly Ile Glu Val Ile Met Asp Val Val	478	40
145 150 155		
TTC AAT CAC ACT GCT GAA GGA AAT GAA AAT GGT CCC ATA CTA TCA TTT Phe Asn His Thr Ala Glu Gly Asn Glu Asn Gly Pro Ile Leu Ser Phe	526	45
160 165 170 175		
AGA GGC ATT GAC AAC AGT GTG TTT TAT ACG CTA GCT CCT AAG GGT GAA Arg Gly Ile Asp Asn Ser Val Phe Tyr Thr Leu Ala Pro Lys Gly Glu	574	50
180 185 190		
TTT TAC AAC TAC TCA GGA TGT GGA AAT ACC TTC AAC TGT AAT AAT CCC Phe Tyr Asn Tyr Ser Gly Cys Gly Asn Thr Phe Asn Cys Asn Asn Pro	622	55
195 200 205		
ATT GTA CGT CAA TTT ATA GTG GAT TGC TTG AGA TAT TGG GTT ACC GAA Ile Val Arg Gln Phe Ile Val Asp Cys Leu Arg Tyr Trp Val Thr Glu	670	60
210 215 220		
ATG CAC GTA GAT GGC TTC CGC TTT GAT CTT GCT TCT ATC CTT ACA AGA Met His Val Asp Gly Phe Arg Phe Asp Leu Ala Ser Ile Leu Thr Arg	718	65
225 230 235		



# DE 196 18 125 A1

	AGT	AGC	AGC	TCG	TGG	AAT	GCT	GTA	AAT	GTC	TAT	GGA	AAT	TCA	ATT	GAC	766
	Ser	Ser	Ser	Ser	Trp	Asn	Ala	Val	Asn	Val	Tyr	Gly	Asn	Ser	Ile	Asp	
	240					245					250					255	
5	GGT	GAC	ATG	ATC	ACC	ACA	GGC	ACT	CCT	CTC	ACA	AGC	CCA	CCA	TTG	ATT	814
	Gly	Asp	Met	Ile	Thr	Thr	Gly	Thr	Pro	Leu	Thr	Ser	Pro	Pro	Leu	Ile	
					260					265					270		
10	GAT	ATG	ATT	AGC	AAT	GAT	CCA	ATA	CTT	AGT	GGA	GTA	AAG	CTT	ATA	GCT	862
	Asp	Met	Ile	Ser	Asn	Asp	Pro	Ile	Leu	Ser	Gly	Val	Lys	Leu	Ile	Ala	
					275				280					285			
15	GAA	GCA	TGG	GAT	TGT	GGA	GGC	CTT	TAC	CAA	GTT	GGC	ATG	TTT	CCG	CAC	910
	Glu	Ala	Trp	Asp	Cys	Gly	Gly	Leu	Tyr	Gln	Val	Gly	Met	Phe	Pro	His	
			290					295					300				
20	TGG	GGT	ATC	TGG	TCG	GAG	TGG	AAC	GGA	AAG	TAC	CGT	GAC	ATG	GTA	CGT	958
	Trp	Gly	Ile	Trp	Ser	Glu	Trp	Asn	Gly	Lys	Tyr	Arg	Asp	Met	Val	Arg	
		305					310					315					
25	CAG	TTC	ATC	AAA	GGC	ACT	GAT	GGG	TTT	TCT	GGG	GCT	TTT	GCT	GAA	TGC	1006
	Gln	Phe	Ile	Lys	Gly	Thr	Asp	Gly	Phe	Ser	Gly	Ala	Phe	Ala	Glu	Cys	
	320					325					330					335	
30	CTT	TGT	GGA	AGC	CCA	AAT	CTA	TAC	CAG	AAA	GGA	GGA	AGA	AAA	CCA	TGG	1054
	Leu	Cys	Gly	Ser	Pro	Asn	Leu	Tyr	Gln	Lys	Gly	Gly	Arg	Lys	Pro	Trp	
					340					345					350		
35	AAC	AGT	ATA	AAT	TTC	GTG	TGT	GCC	CAC	GAT	GGT	TTT	ACT	TTG	GCT	GAT	1102
	Asn	Ser	Ile	Asn	Phe	Val	Cys	Ala	His	Asp	Gly	Phe	Thr	Leu	Ala	Asp	
				355					360					365			
40	TTA	GTG	ACA	TAC	AAC	AAT	AAA	CAC	AAT	TTG	GCA	AAT	GGA	GAG	GAC	AAC	1150
	Leu	Val	Thr	Tyr	Asn	Asn	Lys	His	Asn	Leu	Ala	Asn	Gly	Glu	Asp	Asn	
			370					375					380				
45	AAA	GAT	GGG	GAG	AAT	CAC	AAT	AAT	AGT	TGG	AAT	TGT	GGC	GAG	GAA	GGA	1198
	Lys	Asp	Gly	Glu	Asn	His	Asn	Asn	Ser	Trp	Asn	Cys	Gly	Glu	Glu	Gly	
		385					390					395					
50	GAA	TTT	GCA	AGT	ATC	TTT	GTG	AAG	AAA	TTG	AGG	AAA	AGA	CAA	ATG	CGG	1246
	Glu	Phe	Ala	Ser	Ile	Phe	Val	Lys	Lys	Leu	Arg	Lys	Arg	Gln	Met	Arg	
	400					405				410						415	
55	AAC	TTC	TTC	CTC	TGC	CTT	ATG	GTT	TCC	CAA	GGT	GTT	CCC	ATG	ATA	TAT	1294
	Asn	Phe	Phe	Leu	Cys	Leu	Met	Val	Ser	Gln	Gly	Val	Pro	Met	Ile	Tyr	
					420					425					430		
60	ATG	GGT	GAT	GAA	TAT	GGT	CAC	ACT	AAG	GGA	GGA	AAC	AAC	AAC	ACG	TAT	1342
	Met	Gly	Asp	Glu	Tyr	Gly	His	Thr	Lys	Gly	Gly	Asn	Asn	Asn	Thr	Tyr	
				435				440						445			
65	TGC	CAT	GAC	AAT	TAT	ATT	AAT	TAC	TTC	CGT	TGG	GAT	AAG	AAG	GAT	GAA	1390
	Cys	His	Asp	Asn	Tyr	Ile	Asn	Tyr	Phe	Arg	Trp	Asp	Lys	Lys	Asp	Glu	
			450					455					460				

# DE 196 18 125 A1

TCT TCA TCT GAT TTT TTG AGA TTT TGC GGC CTC ATG ACC AAA TTC CGC Ser Ser Ser Asp Phe Leu Arg Phe Cys Gly Leu Met Thr Lys Phe Arg 465 470 475	1438	
CAT GAA TGT GAA TCA CTG GGA TTA GAT GGT TTC CCT ACA GCA GAA AGG His Glu Cys Glu Ser Leu Gly Leu Asp Gly Phe Pro Thr Ala Glu Arg 480 485 490 495	1486	5
CTG CAA TGG CAT GGT CAC ACT CCT AGA ACT CCA GAT TGG TCT GAA ACA Leu Gln Trp His Gly His Thr Pro Arg Thr Pro Asp Trp Ser Glu Thr 500 505 510	1534	10
AGT CGA TTC GTT GCA TTT ACA CTG GTC GAC AAA GTG AAG GGA GAA CTA Ser Arg Phe Val Ala Phe Thr Leu Val Asp Lys Val Lys Gly Glu Leu 515 520 525	1582	15
TAT ATT GCC TTT AAC GCC AGC CAT TTG CCT GTA ACG ATT ACA CTT CCA Tyr Ile Ala Phe Asn Ala Ser His Leu Pro Val Thr Ile Thr Leu Pro 530 535 540	1630	20
GAA AAG CCT GGT TAT AGA TGG CAG CCG TTT GTG GAC ACA GGC AAA CCA Glu Lys Pro Gly Tyr Arg Trp Gln Pro Phe Val Asp Thr Gly Lys Pro 545 550 555	1678	25
GCA CCA TTT GAC TTC CTG ACA GAC GAT GTT CCT GAG AGA GAG ACA GCA Ala Pro Phe Asp Phe Leu Thr Asp Asp Val Pro Glu Arg Glu Thr Ala 560 565 570 575	1726	30
GCC AAA CAA TAT TCT CAT TTT CTG GAC GCG AAC CAG TAT CCG ATG CTC Ala Lys Gln Tyr Ser His Phe Leu Asp Ala Asn Gln Tyr Pro Met Leu 580 585 590	1774	
AGT TAT TCA TCC ATT ATT CTT TTA CTA TCA TCT GCT GAT GAT GCG T Ser Tyr Ser Ser Ile Ile Leu Leu Leu Ser Ser Ala Asp Asp Ala 595 600 605	1820	35
AGTTTCATTC AACAAAGCCAG GTGAGGTAAA GCAGCTTCAG ATTTTGTTAT ATGCAGTGAG	1880	40
GTGTTACTTT GTAAATAAAG TAAGAAACAG GACAGAACAG AACTGCAAAC AGATAGAACT	1940	
GGTGAGGAAG AAGCTGATGA TTTATAAGAT ACACCTTGTA TTATAATTGT ATTTATATAA	2000	45
AATAAAAAAA AAAAACTAGT GAACTTGTCT GTGCGAAATA AAATGTATAG TTGATTTCAA	2060	
AAAAAAAAAA AAAAAAATAA AAAAAACTCG AGCTCTCTCT CTCTCTCTCT CTCTCTCTCT	2120	50
CTCTCTCTCT CTC	2133	

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 606 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

# DE 196 18 125 A1

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

5	Asn Ser Ala Arg Gly Pro Glu Asp Asp Cys Trp Pro Pro Met Ala Gly	1	5	10	15
	Met Val Pro Ser Ala Ser Asp Gln Phe Asp Trp Glu Gly Asp Leu Leu	20	25	30	
10	Leu Lys Phe Pro Gln Arg Asp Leu Val Ile Tyr Glu Met His Val Arg	35	40	45	
	Gly Phe Thr Asn His Glu Ser Ser Glu Thr Lys Tyr Pro Gly Thr Tyr	50	55	60	
15	Leu Gly Val Val Glu Lys Leu Asp His Leu Lys Glu Leu Gly Val Asn	65	70	75	80
20	Cys Ile Glu Leu Met Pro Cys His Glu Phe Asn Glu Leu Glu Tyr Tyr	85	90	95	
	Ser Tyr Asn Ser Val Leu Gly Asp Tyr Lys Phe Asn Phe Trp Gly Tyr	100	105	110	
25	Ser Thr Val Asn Phe Phe Ser Pro Met Gly Arg Tyr Ser Ser Ala Gly	115	120	125	
30	Leu Ser Asn Cys Gly Leu Gly Ala Ile Asn Glu Phe Lys Tyr Leu Val	130	135	140	
	Lys Glu Ala His Lys Arg Gly Ile Glu Val Ile Met Asp Val Val Phe	145	150	155	160
35	Asn His Thr Ala Glu Gly Asn Glu Asn Gly Pro Ile Leu Ser Phe Arg	165	170	175	
40	Gly Ile Asp Asn Ser Val Phe Tyr Thr Leu Ala Pro Lys Gly Glu Phe	180	185	190	
	Tyr Asn Tyr Ser Gly Cys Gly Asn Thr Phe Asn Cys Asn Asn Pro Ile	195	200	205	
45	Val Arg Gln Phe Ile Val Asp Cys Leu Arg Tyr Trp Val Thr Glu Met	210	215	220	
50	His Val Asp Gly Phe Arg Phe Asp Leu Ala Ser Ile Leu Thr Arg Ser	225	230	235	240
	Ser Ser Ser Trp Asn Ala Val Asn Val Tyr Gly Asn Ser Ile Asp Gly	245	250	255	
55	Asp Met Ile Thr Thr Gly Thr Pro Leu Thr Ser Pro Pro Leu Ile Asp	260	265	270	
60	Met Ile Ser Asn Asp Pro Ile Leu Ser Gly Val Lys Leu Ile Ala Glu	275	280	285	
	Ala Trp Asp Cys Gly Gly Leu Tyr Gln Val Gly Met Phe Pro His Trp	290	295	300	

# DE 196 18 125 A1

Gly Ile Trp Ser Glu Trp Asn Gly Lys Tyr Arg Asp Met Val Arg Gln 305 310 315 320	
Phe Ile Lys Gly Thr Asp Gly Phe Ser Gly Ala Phe Ala Glu Cys Leu 325 330 335	5
Cys Gly Ser Pro Asn Leu Tyr Gln Lys Gly Gly Arg Lys Pro Trp Asn 340 345 350	
Ser Ile Asn Phe Val Cys Ala His Asp Gly Phe Thr Leu Ala Asp Leu 355 360 365	10
Val Thr Tyr Asn Asn Lys His Asn Leu Ala Asn Gly Glu Asp Asn Lys 370 375 380	15
Asp Gly Glu Asn His Asn Asn Ser Trp Asn Cys Gly Glu Glu Gly Glu 385 390 395 400	
Phe Ala Ser Ile Phe Val Lys Lys Leu Arg Lys Arg Gln Met Arg Asn 405 410 415	20
Phe Phe Leu Cys Leu Met Val Ser Gln Gly Val Pro Met Ile Tyr Met 420 425 430	25
Gly Asp Glu Tyr Gly His Thr Lys Gly Gly Asn Asn Asn Thr Tyr Cys 435 440 445	
His Asp Asn Tyr Ile Asn Tyr Phe Arg Trp Asp Lys Lys Asp Glu Ser 450 455 460	30
Ser Ser Asp Phe Leu Arg Phe Cys Gly Leu Met Thr Lys Phe Arg His 465 470 475 480	35
Glu Cys Glu Ser Leu Gly Leu Asp Gly Phe Pro Thr Ala Glu Arg Leu 485 490 495	
Gln Trp His Gly His Thr Pro Arg Thr Pro Asp Trp Ser Glu Thr Ser 500 505 510	40
Arg Phe Val Ala Phe Thr Leu Val Asp Lys Val Lys Gly Glu Leu Tyr 515 520 525	45
Ile Ala Phe Asn Ala Ser His Leu Pro Val Thr Ile Thr Leu Pro Glu 530 535 540	
Lys Pro Gly Tyr Arg Trp Gln Pro Phe Val Asp Thr Gly Lys Pro Ala 545 550 555 560	50
Pro Phe Asp Phe Leu Thr Asp Asp Val Pro Glu Arg Glu Thr Ala Ala 565 570 575	55
Lys Gln Tyr Ser His Phe Leu Asp Ala Asn Gln Tyr Pro Met Leu Ser 580 585 590	
Tyr Ser Ser Ile Ile Leu Leu Leu Ser Ser Ala Asp Asp Ala 595 600 605	60

## Patentansprüche

1. Nucleinsäuremolekül, das ein Protein mit der biologischen Aktivität eines Debranching-Enzyms aus *Solanum tuberosum* codiert, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus:
  - (a) Nucleinsäuremolekülen, die ein Protein codieren, das die unter SeqID No. 2 angegebene Aminosäure-

resequenz aufweist;

(b) Nucleinsäuremolekülen, die die unter Seq ID No. 1 angegebene Nucleotidsequenz enthalten;

(c) Nucleinsäuremolekülen, die mit einem Nucleinsäuremolekül nach (a) oder (b) hybridisierbar sind; und

(d) Nucleinsäuremolekülen, deren Nucleotidsequenz aufgrund der Degeneration des genetischen Codes von der Nucleotidsequenz eines Nucleinsäuremoleküls nach (a), (b) oder (c) abweicht.

2. Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 1, das ein cDNA-Molekül ist.

3. Nucleinsäuremolekül von mindestens 15 bp Länge, das spezifisch mit einem Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 1 oder 2 hybridisiert.

4. Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 3, das spezifisch mit einem Transkript eines Nucleinsäuremoleküls nach Anspruch 1 oder 2 hybridisiert und dadurch dessen Translation verhindert.

5. Vektor enthaltend ein Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 1 oder 2.

6. Vektor nach Anspruch 5, wobei das Nucleinsäuremolekül in sense-Orientierung mit regulatorischen Elementen verknüpft ist, die die Transkription und Translation in prokaryontischen oder eukaryontischen Zellen ermöglichen.

7. Wirtszelle, die mit einem Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 1 oder 2 oder mit einem Vektor nach Anspruch 5 oder 6 transformiert wurde, oder von einer solchen Zelle abstammt.

8. Verfahren zur Herstellung eines Proteins mit der biologischen Aktivität eines Debranching-Enzyms aus *Solanum tuberosum*, bei dem Wirtszellen nach Anspruch 7 unter geeigneten Bedingungen kultiviert werden und das synthetisierte Protein aus der Kultur gewonnen wird.

9. Protein mit der biologischen Aktivität eines Debranching-Enzyms aus *Solanum tuberosum*, das codiert wird von einem Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 1 oder 2.

10. Wirtszelle nach Anspruch 7, die eine transgene Pflanzenzelle ist und wobei ein Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 1 oder 2 stabil, im Genom integriert vorliegt und exprimiert wird.

11. Transgene Pflanze enthaltend transgene Pflanzenzellen nach Anspruch 10.

12. Transgene Pflanzenzelle nach Anspruch 11, die eine stärkepeichernde Pflanze ist.

13. Transgene Pflanze nach Anspruch 12, die eine Getreidepflanze ist.

14. Transgene Pflanze nach Anspruch 12, die eine Kartoffelpflanze ist.

15. Stärke erhältlich aus Pflanzenzellen nach Anspruch 10 oder aus Pflanzen nach einem der Ansprüche 11 bis 14.

16. Transgene Pflanzenzelle, bei der die Aktivität eines Debranching-Enzyms, das durch ein Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 1 oder 2 codiert wird, reduziert ist im Vergleich zu nichttransformierten Zellen aufgrund der Inhibition der Transkription oder Translation von endogenen Nucleinsäuremolekülen, die ein Debranching-Enzym codieren.

17. Transgene Pflanzenzelle nach Anspruch 16, enthaltend ein Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 1 oder 2 oder einen Teil eines solchen Nucleinsäuremoleküls, wobei das Nucleinsäuremolekül oder der Teil davon in antisense-Orientierung mit regulatorischen Elementen verknüpft ist, die die Transkription in pflanzlichen Zellen gewährleisten.

18. Transgene Pflanzenzelle nach Anspruch 16 oder 17, exprimierend ein Ribozym, das spezifisch Transkripte von Nucleinsäuremolekülen nach Anspruch 1 oder 2 spaltet.

19. Transgene Pflanzen enthaltend Pflanzenzellen nach einem der Ansprüche 16 bis 18.

20. Transgene Pflanze nach Anspruch 19, die eine Kartoffelpflanze ist.

21. Stärke erhältlich aus Pflanzenzellen nach einem der Ansprüche 16 bis 18 oder aus Pflanzen nach Anspruch 19 oder 21.

22. Vermehrungsmaterial von Pflanzen nach einem der Ansprüche 11 bis 14 oder nach Anspruch 19 oder 20 enthaltend Pflanzenzellen nach Anspruch 10 oder einem der Ansprüche 16 bis 18.

23. Verwendung der Stärke nach Anspruch 15 oder 21 zur Herstellung von Lebensmitteln oder industriellen Produkten.